Biochimie structurale

Glucides.

Introduction.

Glucides = $C_n(H_2O)_n$ Þ "hydrates de carbone" ([1]) ou polysaccharides

Très répandus dans la matière vivante : 5% poids sec animaux, 70% poids sec végétaux (⇒ importance des polymères)

En alimentation : pain, sucre, céréales, lait

- Oses : glucides simples, non hydrolysables en milieu acide
- Osides : glucides complexes, dont l'hydrolyse donne plusieurs produits :
  - holosides : constitués uniquement d'oses simples (amidon, glycogène, saccharose)
  - hétérosides : constitués d'une partie glucidique ± importante et d'un aglycone = partie non glucidique (chaîne carbonée autre).

Oses.

Composés les plus simples : chaîne carbonée linéaire (au moins en théorie)

[1] Le terme « hydrate de carbone » correspond à la traduction de l'américain « carbohydrate » mais n'a pas de sens en français : seuls les termes « glucide » ou « ose » et leurs dérivés doivent être employés.

Tous les carbones portent une fonction alcool primaire ou secondaire sauf :

un aldéhyde sur C_1 = aldoses
une cétone sur C_2 = cétoses

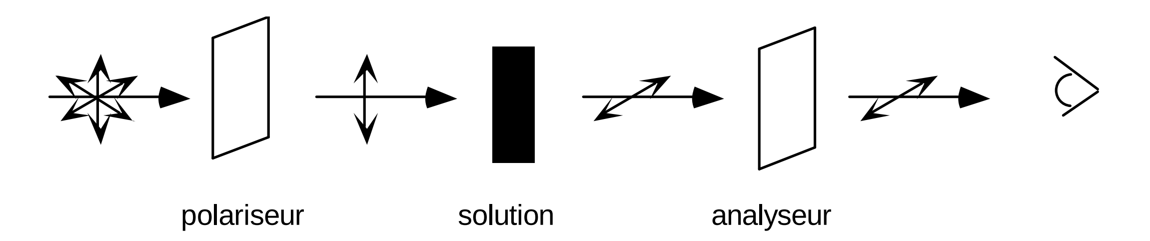
Ces deux fonctions sont réductrices (*cf. infra*).

Aldoses.

Le plus simple comporte 3 C : glycéraldéhyde = aldéhyde glycérique

la molécule possède 1 C asymétrique ⇒ 2 énantiomères possibles : D = OH à droite ou L = OH à gauche

On connaît sa configuration absolue ⇒ base pour la nomenclature de tous les autres glucides. On regarde l'avant dernier carbone. **Les glucides naturels sont de la série D**.



Par ailleurs l'asymétrie du carbone confère à la molécule un pouvoir rotatoire, c'est à dire qu'une solution de glucide est susceptible de dévier le plan de vibration d'une lumière polarisée. L'angle de déviation dépend de plusieurs facteurs, notamment le pH, la concentration et la longueur du trajet optique (conditions standardisées), mais aussi de la nature du glucide.

Les glucides qui dévient la lumière à droite sont dits dextrogyres et notés (+), ceux qui la dévient à gauche sont lévogyres (-).

$[\alpha]=1000A/(Cl)$

Il ne faut pas confondre les notations ni les notions d'énantiomères et de pouvoir rotatoire, malgré l'analogie possible.

Par la synthèse de Kiliani, on peut passer d'un glucide à (n) carbones à son homologue supérieur à (n+1) carbones. Cette synthèse n'est pas stéréospécifique mais fournit deux épimères (isomères se différenciant par la position d'un groupement hydroxyle).

Aldoses remarquables : glycéraldéhyde ; érythrose ; ribose ; arabinose ; xylose ; glucose ; mannose ; galactose.

Cétoses.

On peut faire dériver les cétoses de la dihydroxyacétone : $CH_2OH\text{-}CO\text{-}CH_2OH$.

Les cétoses portent une fonction cétone sur le deuxième carbone, ce qui fait qu'ils possèdent un carbone asymétrique de moins que leur homologue aldose.

Les autres propriétés sont semblables à celles des aldoses.

Cétoses remarquables : dihydroxyacétone ; ribulose ; fructose.

Composés apparentés aux oses.

N-acétyl-D-glucosamine

Acide D glucuronique

Osamines.

L'hydroxyle du C2 est remplacé par une amine : galactosamine, glucosamine, ou encore par NH-CO-CH2 : N-acétyl-glucosamine

Acides uroniques.

Oxydation de la fonction alcool I en fonction carboxylique (et conservent fonction aldéhyde) : acide glucuronique (forme de détoxication), acide galacturonique (pectines).

Sorbitol

Autres.

Acide ascorbique = Vitamine C

Polyalcools = polyols

Propriétés des oses.

Cyclisation.

Mise en évidence ; Nature.

Le pouvoir rotatoire d'une solution de glucose évolue au cours du temps, alors que c'est en théorie une constante, au même titre que le point de fusion ou la masse moléculaire. Par ailleurs, certaines réactions caractéristiques des aldéhydes ne se font pas complètement. Ces observations et d'autres ont conduit à postuler l'existence d'un carbone asymétrique supplémentaire par rapport à la forme linéaire.

Cette situation est possible par l'apparition d'un cycle formé par l'élimination d'une molécule d'eau entre la fonction aldéhydique et l'hydroxyle porté par le carbone 4 ou le carbone 5.

Dans le cas du pont oxydique 1-5, on a un cycle hexagonal comportant 5 atomes de carbone et 1 atome d'oxygène : c'est un noyau pyrannose[2]. Dans le cas du pont 1-4, on a un cycle pentagonal à 4 atomes de carbone et 1 oxygène : c'est un noyau furannose.

L'éloignement des carbones 1 et 4/5 et faible lorsqu'on prend en considération non la représentation linéaire, mais la représentation spatiale des molécules.

---

[2] pyranne = H_2C–O, HC, CH, C–C, H H ; furanne = O, HC, CH, C–C, H H

Formes chaise et bateau.

Les cycles peuvent prendre deux formes différentes dans l'espace : la forme chaise ou la forme bateau. Ceci est dû principalement à des problèmes liés d'une part aux contraintes créées par les liaisons et leurs angles, et d'autre part par l'encombrement stérique des atomes. Ces formes sont des états d'équilibre.

On admet que la configuration en chaise est la plus stable, et que c'est de cette façon que sont les oses en solution.

Nomenclature.

Lorsque le groupement hydroxyle porté par le carbone 1 est en dessous du plan du cycle, c'est un α-pyrannose, tandis que si elle est au-dessus, c'est un ß-pyrannose (ou furannose).

Propriétés chimiques des oses.

Solubilité.

Les oses sont de petites molécules, très polarisables : ils sont donc très solubles dans l'eau (jusqu'à 3 M, c'est à dire 540 $g.l^{-1}$!).

Estérification.

alcool + acide Þ ester + eau

La fonction alcool primaire des glucides peut facilement être estérifiée, notamment par de l'acide phosphorique : les oses impliqués dans le métabolisme sont le plus souvent sous cette forme : glucose-6-P, fructose 1 ou 6 ou 1,6 P, etc., ce qui correspond en fait à une énergisation de ces composés.

Oxydation des oses = caractère réducteur.

La fonction aldéhydique ou cétonique des oses est susceptible d'être oxydée, les oses sont donc des composés réducteurs :

glucide réducteur + 2 Cu^{2+} þ glucide oxydé + 2 Cu^{+}

Le cuivre présent dans la liqueur de Felhing réagit ensuite avec la soude pour donner un précipité rouge brique caractéristique :

2 Cu^{+} + 2 OH^{-} þ 2 CuOH þ Cu_2O + H_2O

Action des acides concentrés.

Sous l'action d'un acide concentré à chaud, les aldoses et les cétoses donnent naissance au furfural ou à des dérivés de furfural. Celui-ci peut ensuite réagir avec divers phénols et donner des colorations caractéristiques et quantitatives. Par ailleurs, c'est un des principes de la réaction de Maillard (coloration de la croûte du pain, caramélisation, etc.)

Osides.

Holosides.

La liaison osidique.

Les fonctions hydroxyle de deux oses peuvent se condenser en libérant une molécule d'eau et former une liaison entre les oses :

R_1-CH-OH + H-OCH-R_2 þ R_1-CH-O-CH-R_2 + H_2O

La fonction réductrice peut être libre ou engagée dans la liaison osidique, donc le polyholoside ne sera pas forcément réducteur, même si les osides qui le composent le sont.

Diholosides.

Composés formés de 2 oses liés par une liaison osidique :

Maltose : α D glucopyrannosyl (1-4) D glucopyrannose ;

Cellobiose : ß D glucopyrannosyl (1-4) D glucopyrannose ;

Lactose : ß D galactopyrannosyl (1-4) D glucopyrannose ;

Saccharose : α D glucopyrannosyl (1-2) ß D fructofurannose.

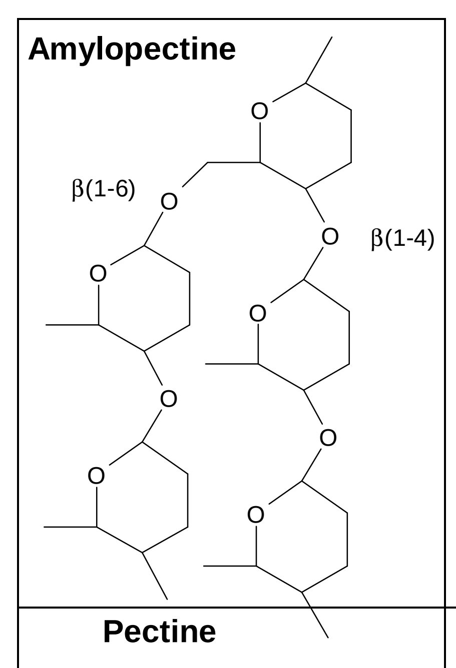
Maltose :
αDglucopyrannosyl (1-4)Dglucopyrannose

Saccharose :
αDglucopyrannosyl (1-2)Dfructofurannose

Lactose :
βDgalactopyrannosyl (1-4)Dglucopyrannose

Cellobiose :
βDglucopyrannosyl (1-4)Dglucopyrannose

Polyholosides.



Pectine

Galactose

Acides galacturoniques

- **Amidon** : réserve glucidique des végétaux

  ⇒ amylose : liaisons α 1-4, MM 150 000 à 600 000

  ⇒ amylopectine : liaisons α 1-4 et α 1-6 : ramifications possibles

- **Glycogène** : réserve chez les animaux

  ⇒ même structure que l'amylopectine, mais plus ramifiée

- **Cellulose** : constituant des parois végétales

  ⇒ liaisons ß 1-4 ; structure fibreuse

- **Autres :**

  ⇒ dextranes (bactéries)

  ⇒ chitine : polymère de N-acétyl glucosamine

  ⇒ pectine : polymère d'acides galacturoniques

Hétérosides.

Partie non osidique = aglycone ⇒ stérols, phénols,…

Lipides.

Introduction.

Les lipides sont des substances insolubles en milieu aqueux, mais solubles dans les solvants organiques : éthanol, chloroforme, éther,… Ce sont les huiles (liquides) et les graisses (gélifiées ou solides).

Il existe plusieurs classifications anciennes, basées sur les produits d'hydrolyse (lipides simples ou complexes), mais elles sont abandonnées au profit d'une classification basée sur la structure.

Acides gras.

En petite quantité à l'état libre, mais en grande quantité engagés dans des liaisons ester ou amide. En général, acides monocarboxyliques à chaîne linéaire non ramifiée contenant un nombre pair d'atomes de carbone (4 - 30).

> Par convention, on numérote les atomes de carbone
>
> à partir de celui qui porte la fonction carboxyle.

Acides gras saturés.

Formule.

$$CH_3\text{-}(CH_2)_n\text{-}COOH = C_nH_{2n}O_2$$

Les plus fréquents sont l'acide palmitique (C_{16}, n = 14) et l'acide stéarique (C_{18} ; n = 16). En moins grande quantité, on trouve des acides à soit 14, soit 20 carbones. Les autres sont plus rares et ne se rencontrent que dans des tissus spécialisés.

Les acides gras à nombre impair de carbones sont très rares, mais ils existent.

La chaîne carbonée forme un zigzag.

```
     H2   H2   H2   H2   H2   H2   H2   H2
     C    C    C    C    C    C    C    C    COOH
H3C    C    C    C    C    C    C    C    C
       H2   H2   H2   H2   H2   H2   H2   H2
```

Acide stéarique: C_{18}

```
     H2   H2   H2   H2        H2   H2   H2   H2
     C    C    C    C         C    C    C    C
H3C    C    C    C    C=C       C    C    C    COOH
       H2   H2   H2   H H       H2   H2   H2
```

Acide oléique: $C_{18:1}$

Nomenclature.

acide myristique	=	C_{14}	=	acide n tétradécanoïque
acide palmitique	=	C_{16}	=	acide n hexadécanoïque
acide stéarique	=	C_{18}	=	acide n octadécanoïque

Acides gras insaturés.

Dits aussi désaturés, ils comportent au moins une double liaison C = C, c'est à dire qu'ils ne sont pas saturés en hydrogène.

Acides gras monoinsaturés.

Ils ne comportent qu'une seule double liaison

acide oléique= $C_{18:1}$ = acide 9-ène octadécanoïque

$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$

Acides gras polyinsaturés.

Ils comportent plusieurs doubles liaisons :

$C_{18:2}$ acide linoléique CH_3-$(CH_2)_4$-CH=CH-CH_2-CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH

$C_{18:3}$ acide linolénique CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH

Les doubles liaisons ne sont généralement pas conjuguées (elles sont séparées par un méthylène -CH_2-), mais on rencontre des cas de conjugaison chez certains végétaux.

Acides gras spéciaux.

Certaines structures particulières peuvent se rencontrer :

⇒ ramification

⇒ nombre impair de carbones

⇒ les deux : ramification et nombre impair de C

⇒ triple liaison

⇒ cyclisation

Propriétés des acides gras.

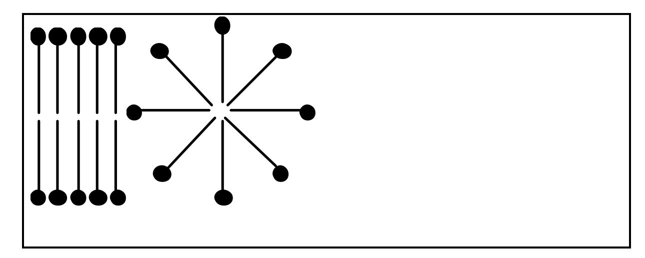
Propriétés physiques.

⇒ **solubilité** dans les solvants organiques

⇒ **point de fusion** : dépend de 2 facteurs :

- nombre de carbones : le point de fusion augmente avec le nombre de carbones, pour une série homologue.
- le degré d'insaturation : le point de fusion diminue avec l'insaturation, pour un nombre constant d'atomes de C.

Acide gras	Point de fusion (°C)
C18 :0	69
C18 :1	16
C18 :2	-5
C18 :3	-11



Les lipides présents en milieu aqueux s'associent d'une façon stable thermodynamiquement : **structure feuilletée** ou **structure en micelles**. De toute façon, les pôles hydrophobes (apolaires) se font face, tandis que les pôles hydrophiles (polaires) font face au milieu aqueux. Les micelles peuvent être renversés lorsque les lipides sont en plus grande quantité que l'eau : celle-ci se trouve alors piégée dans des gouttelettes au sein de la phase lipidique.

Propriétés chimiques.

Saponification.

$$R\text{-}COOH + NaOH \Rightarrow R\text{-}COO^-, Na^+ + H_2O$$

Un acide gras en présence d'une base forte, à chaud, donne un sel ou savon, et de l'eau. Le savon est soluble dans l'eau, et présente des propriétés détergentes et un pouvoir moussant.

On peut doser les acides gras à l'aide d'une solution de potasse (KOH) alcoolique, en présence de phénolphtaléine. Ceci permet d'évaluer la quantité globale d'acides gras libres. On obtient un indice d'acide, correspondant aux mg de potasse nécessaires pour neutraliser l'acidité libre contenue dans 1 g de matière grasse.

Glycérolipides.

On distingue deux grands groupes : les glycérides et les phospholipides. Leur structure est commune : un glycérol est estérifié par plusieurs acides gras.

G l y c é r i d e s .

Nature.

Neutres, ils ne contiennent que C,H et O. Ce sont des esters d'acide gras et de glycérol :

CH_2OH		R_1-COOH	CH_2-O-C=O-R_1
CHOH	+	R_2-COOH	CH-O-C=O-R_2
CH_2OH		R_3-COOH	CH_2-O-C=O-R_3

Une ou plusieurs des trois fonctions alcool du glycérol peuvent être estérifiées, et ceci par le même acide gras ou par des acides gras différents. Les Triglycérides sont les constituants majeurs du tissu adipeux des animaux, et des huiles et graisses végétales.

$R_1 = R_2 = R_3 = C_{17}H_{33} \Rightarrow$ homogène : trioléate de glycéryle (oléique = $C_{18:1}$) ;

$R_1 = R_3 = C_{17}H_{33}$; $R_2 = C_{17}H_{35} \Rightarrow$ hétérogène : oléate-1 stéarate-2 oléate-3 de glycéryle.

Propriétés physiques.

Le point de fusion dépend des acides gras estérifiant le glycérol. Mêmes règles.

Les glycérides sont insolubles dans l'eau.

Propriétés chimiques.

Hydrolyse - Saponification.

Hydrolyse enzymatique (lipases) $\Rightarrow$ glycérol + acides gras ;

ou en milieu alcalin à chaud ⇒ glycérol + savons (sels d'acides gras).

⇒ indice d'estérification = mg de NaOH nécessaires pour estérifier 1 g de matière grasse.

Indice de saponification = indice d'acidité + indice d'estérification

Réactions liées à l'insaturation.

⇒ hydrogénation = ajout de H à des acides insaturés : sous pression, avec un catalyseur ;

⇒ addition d'halogènes : l'iode se fixe uniquement sur les doubles liaisons. L'indice d'iode correspond aux mg d'I_2 que peuvent fixer 100 g de matières grasses. L'indice d'iode permet de calculer l'insaturation des lipides.

⇒ oxygénation : donne le goût rance aux matières grasses.

Phospholipides (Glycérophospholipides).

Nature.

Ce sont des glycérolipides dont un des carbones du glycérol porte non un acide gras, mais un acide phosphorique, ce qui donne un **acide phosphatydique**.

$H_2C-O-C-R_1$
$R_2-C-O-CH$
$H_2C-O-P-O-\{C(H_2)-C(H_2)-N^+(CH_3)_3\}$

Choline

Phosphatidyl choline

(Les flèches indiquent les liaisons susceptibles d'être hydrolysées par des enzymes.)

$CH_2\text{-}O\text{-}C\text{=}O\text{-}R_1$

$C_{ß}H_2\text{-}O\text{-}C\text{=}O\text{-}R_2$

$C_{\alpha}H_2\text{-}O\text{-}PO_3H_2$

Le groupement phosphoryle peut être porté soit par le carbone α, soit par le carbone ß.

La fonction acide du phosphoryle peut être elle-même estérifiée, par diverses molécules alcooliques : choline, éthanolamine, sérine. Les phospholipides sont des intermédiaires importants du métabolisme.

Rôles.

Une molécule ayant deux charges opposées à des propriétés tensioactives, c'est à dire qu'elle permet de stabiliser des émulsions.

Ce sont les phospholipides de la membrane plasmique. Alors que les acides gras constituent la partie hydrophobe, l'acide phosphorique constitue la partie hydrophile. Ces acides gras s'arrangent naturellement en structure feuilletée ⇒ bicouche lipidique.

Si on agite, la structure feuilletée est désordonnée et les lipides peuvent se réarranger en micelles.

Action des enzymes sur les phospholipides.

L'action des enzymes permet, par les produits qu'elle libère, de déterminer précisément la composition de lipides inconnus.

Autres types de lipides.

Sphingolipides.

Les acides gras ne sont plus liés à une molécule de glycérol, mais à une sphingosine :

Comme dans le cas des phospholipides, l'acide phosphorique peut être estérifié (par la choline ⇒ sphingomyéline).

L'un des H de la fonction amine est substitué et porte donc un radical lié par une amide (ce n'est plus un ester).

Importants

Cérides.

Esters d'acide gras et d'alcool à chaîne non ramifiée ayant un nombre pair d'atomes de carbone.

Constituants majeurs de la cire des abeilles.

Stérides et composés isoprèniques.

La structure isoprène se répète un certain nombre de fois, éventuellement en formant des cycles.

ß carotène : pigment important des végétaux, inclus dans les membranes des thylakoïdes du fait de son caractère hydrophobe fort.

Stérides : esters d'acides gras et de stérol. Entrent dans le métabolisme des stéroïdes (hormones).

Méthodes d'analyse.

Extraction.

L'extraction des lipides se fait au moyen de solvants organiques, tels que le chloroforme, le méthanol, etc.

Après broyage du matériel biologique, on ajoute le solvant, et agite et on laisse reposer.

Les phases aqueuses (contenue dans le matériel) et organique se séparent par décantation.

On recueille la phase organique.

Séparation et dosage.

La séparation des lipides du solvant de départ ainsi qu'entre eux se fait par des techniques chromatographiques.

Le principe est que chaque molécule possède une affinité propre pour une certaine autre molécule (solide, liquide ou gazeuse). Si on fait passer un mélange complexe sur cette molécule, les constituants du mélange seront d'autant plus retenus que leur affinité sera grande. En utilisant des jeux de colonnes et de solvants adaptés, on peut donc séparer les différents éléments du mélange.

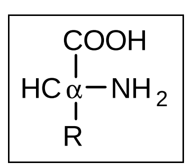
Grâce à un système de détection approprié, on peut ensuite quantifier chaque espèce moléculaire sortant de l'appareillage.

- Chromatographie basse pression sur colonne
- Chromatographie liquide haute pression
- Chromatographie sur couche mince

- Chromatographie en phase gazeuse (demandant une dérivation préalable, mais de loin la mieux adaptée aux lipides).

Peptides.

Acides aminés.



Formule générale.

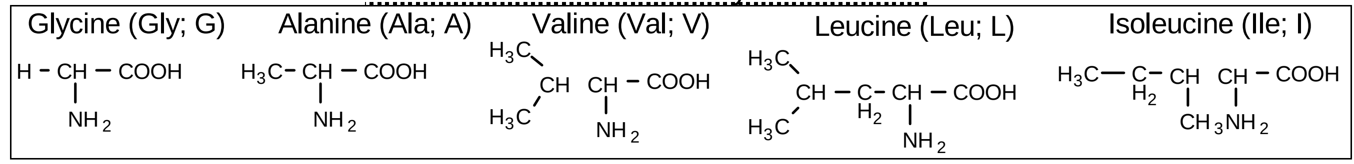
Le carbone portant la fonction carboxylique acide est dit "0", donc le carbone suivant est le carbone α. Il porte la fonction amine NH2. Ce sont donc des **acides α aminés**. On trouve en gros 20 AA naturels protéinogènes, combinés ou non soit entre eux, soit avec d'autres molécules.

Principaux acides aminés naturels.

Acides aminés aliphatiques.

Le radical R est une chaîne carbonée, ramifiée ou non :

Acides aminés à chaîne hydrocarbonée:

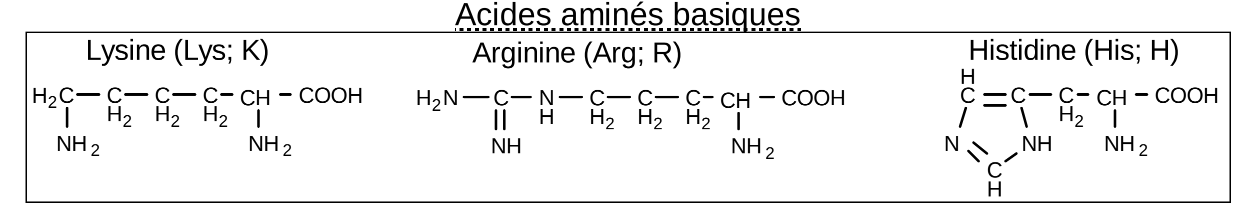


Acides aminés hydroxylés / Acides aminés soufrés

Sérine (Ser; S)	Thréonine (Thr; T)	Cystéine (Cys; C)	Méthionine (Met; M)
$H_2C-CH-COOH$ (OH sur H_2C, NH_2 sur CH)	$H_3C-CH-CH-COOH$ (OH, NH_2)	$HS-C(H_2)-CH-COOH$ (NH_2)	$CH_2-S-C(H_2)-C(H_2)-CH-COOH$ (NH_2)

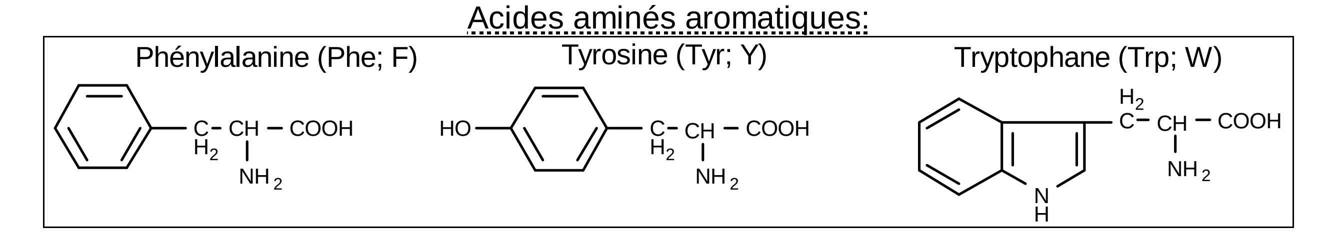
Acides aminés dicarboxyliques et leurs amides:

Ac. aspartique (Asp; D)	$HOOC-C(H_2)-CH-COOH$ (NH_2)	Asparagine (Asn; N)	$OC-C(H_2)-CH-COOH$ (NH_2, NH_2)
Ac. glutamique (Glu; E)	$HOOC-C(H_2)-C(H_2)-CH-COOH$ (NH_2)	Glutamine (Gln; Q)	$OC-C(H_2)-C(H_2)-CH-COOH$ (NH_2, NH_2)



Acides aminés cycliques.

L'atome d'azote des acides hétérocycliques est en fait une imine : acides iminés.



Acides aminés hétérocycliques:

Proline (Pro; P) — Hydroxyproline — Ac. pipécolique

Propriétés.

Carbone asymétrique.

Glycéraldéhyde		Alanine	
CHO H — C — OH CH_2OH	CHO HO — C — H CH_2OH	COOH H — C — NH_2 CH_3	COOH H_2N — C — H CH_3
D	L	D	L

A l'exception de la glycine, tous les acides aminés comportent au moins un carbone asymétrique. Comme dans le cas des glucides, on distinguera les deux séries, D et L, mais les **acides aminés naturels sont de la série L** (glucides de la série D).

Pour les mêmes raisons, ces molécules sont dotées d'un pouvoir rotatoire.

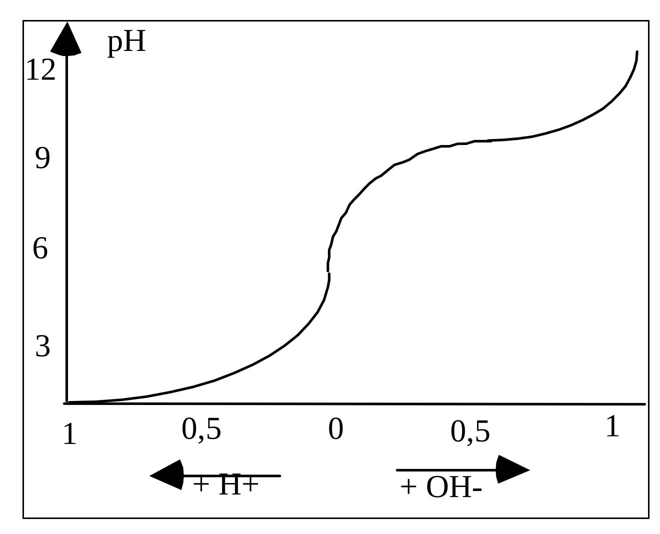
Dissociation.

En fonction du pH du milieu, les fonctions acides ou basiques se dissocient. Par exemple, en milieu acide, un excès de protons bloque la fonction carboxyle, qui ne se dissocie pas, tandis que la fonction amine peut accepter un proton supplémentaire :

acide $R\text{-}CH\text{-}NH_2\text{-}COOH + H^+$ þ $R\text{-}CH\text{-}NH_3^{(+)}\text{-}COOH$ (1)

neutre $R\text{-}CH\text{-}NH_2\text{-}COOH + OH^-$ þ $R\text{-}CH\text{-}NH_2\text{-}COO^-$

basique $R\text{-}CH\text{-}NH_2\text{-}COOH$ þ $R\text{-}CH\text{-}NH_3^{(+)}\text{-}COO^-$ (2)



Les constantes de dissociation des deux fonctions sont elles aussi caractéristiques de l'acide aminé :

$$K_1 = \frac{[R-COO^-][H^+]}{R-COOH} \quad \text{et } K_2 = \frac{[R-NH_2][H^+]}{[R-NH_3^+]}$$

Bien que les valeurs exactes varient d'un composé à l'autre, on peut considérer que $K_1 \pm 10^{-4}$ à 10^{-6} et $K_2 \pm 10^{-8}$ à 10^{-10}. A pH = 7, pour des valeurs moyennes de $K_1 = 10^{-5}$ et $K_2 = 10^{-9}$, on a :

$$10^{-5} = \frac{[R-COO^-]\times 10^{-7}}{[R-COOH]} \Leftrightarrow \frac{[R-COO^-]}{[R-COOH]} = 10^{-2}$$

Ce qui revient à dire qu'à pH = 7, il y a une molécule non dissociée pour 100 molécules ionisées. De la même façon, on calcule :

$10^{-9} = \frac{[R-NH_2]\times 10^{-7}}{[R-NH_3^+]} \Leftrightarrow \frac{[R-NH_2]}{[R-NH_3^+]} = 10^{-2}$ Il y a là aussi 1% de formes non dissociées. Lorsque la concentration en H^+ est égale à K_1, c'est à dire quand pK_1 = pH, il y a autant de molécules non dissociées que d'anions. **Le pK correspond au pH de demi-dissociation.**

Les acides aminés sont donc des composés amphotères, les deux fonctions sont ionisables. On définit le **point isoélectrique ou pHi** comme la valeur du pH pour laquelle on obtient une forme comportant les deux fonctions ionisée et appelée **amphiion**. Le pHi est une valeur caractéristique de l'acide aminé.

$pH_i = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$ La présence de plusieurs groupes carboxyles ou aminés sur une même molécule entraîne une modification du pHi par rapport à une molécule n'ayant qu'un seul de chaque groupement. Le pHi est alors calculé sur l'ensemble des groupements.

En fonction de l'ionisation de l'acide aminé, il se déplacera dans un champ électrique soit vers la cathode (s'il est chargé positivement), soit vers l'anode (charge négative).

Solubilité.

Les acides aminés sont solubles dans l'eau, pas dans les solvants organiques (la nature du radical peut cependant modifier cette solubilité).

Réactivité.

Liaison peptidique.

Elle est liée à la présence des deux groupements qui peuvent réagir ensemble pour former une liaison peptidique :

$$R_1-\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}-NH_2 \quad + \quad HOOC-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-R_2 \longrightarrow R_1-\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}-\underset{H}{N}-\underset{O}{C}-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{\underset{H}{C}}}-R_2$$

Les atomes engagés dans la liaison peptidique sont tous placés dans le même plan.

Grâce à cette liaison peptidique, des polymères de taille parfois très grande peuvent être formés :

acide aminé = 1 < oligopeptide < 4 - 5 < polypeptide < 100 < protéine

⇒ sujet des chapitres suivants.

Réactions liées au carboxyle.

A pH très élevé, il peut donner un sel.

La décarboxylation peut être réalisée chimiquement ou par une enzyme. Elle conduit à la formation d'une amine simple ($R-CH_2-NH_2$), et elle intervient fréquemment dans le métabolisme (interconversion de composés).

Réactions liées à l'amine.

Les hydrogènes de l'amine peuvent être substitué par d'autres radicaux, aliphatiques, aromatiques, etc.

Les acides dicarboxyliques et leurs amines sont importants pour le transfert des groupements aminés : intervention de transaminases :

R1-CO-NH2 + R2-CO-COOH Û R1-CO-COOH + R2-CO-NH2

Glu + AOA ⇔ αKG + Asp   Glu + Pyr ⇔ αKG + Ala

Le formol agit sur la fonction amine primaire pour conduire à la formation d'une amine tertiaire :

$$R-CH(COO^-)(NH_2) + 2\ H-CHO \longrightarrow R-CH(COO^-)-N(CH_2OH)_2$$

Réaction à la ninhydrine.

Les acides aminés réagissent avec la ninhydrine oxydée pour former un complexe de deux molécules de ninhydrine (réduites) liées par l'azote de l'AA. Ce complexe absorbe fortement à 570 nm environ et la réaction sert au dosage des acides aminés.

Méthodes d'analyse.

L'extraction des acides aminés libres peut se faire simplement à l'eau, puisqu'ils sont solubles.

On les sépare sur des colonnes échangeuses d'anions ou de cations, c'est à dire en fonction de leur caractère acide ou basique à un pH donné : on recueille ainsi trois fractions, acide, basique et neutre. La fraction neutre contient en plus les glucides solubles.

La séparation fine se fait généralement par chromatographie (papier, basse ou haute pression, CCM,…). On utilise fréquemment l'électrophorèse (sur papier ou sur gel) pour analyser les acides aminés. Le support est placé dans une solution tamponnée (⇒ pH choisi convenablement) et soumis à un champ électrique. En fonction du pH et du champ, les AA migrent dans un sens, dans l'autre, ou restent au niveau du dépôt.

L'analyse et la quantification se font généralement soit par réaction colorée (ninhydrine), soit par détection dans l'UV à des longueurs d'onde généralement inférieures à 230 nm (les glucides, par exemple, n'absorbent pas dans l'UV et donc n'interfèrent pas dans le dosage).

Peptides et protéines.

Les peptides sont de petits polymères d'acides aminés, liés entre eux par des liaisons peptidiques. La réaction du biuret permet le dosage des peptides en milieu alcalin : les liaisons peptidiques forment un complexe violet en présence d'ions cuivriques.

Leurs propriétés sont intermédiaires entre celles des acides aminés et celles des protéines.

Ils sont plus ou moins solubles dans l'eau, et présentent un caractère amphotère, lié à leur pHi

Généralités.

Polymères d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques. Il existe 20 AA majeurs entrant dans la composition des protéines (plus quelques autres, un peu originaux).

Les conventions d'écriture placent la fonction N terminale à gauche, et la fonction C terminale à droite.

Les protéines jouent différents rôles dans l'organisme : structure (maintien de la membrane plasmique) ou métabolisme (enzymes ; protéines porteuses,…)

Structure primaire.

C'est la séquence en acides aminés.

Composition en acides aminés.

Hydrolyse.

La composition brute en AA peut être déterminée par hydrolyse chimique (HCl 6N, 105°C, 24 h, ampoule scellée). Le mélange obtenu est ensuite analysé par chromatographie (papier 2 dimensions, HPLC, …). Cette méthode pose problème car elle conduit à la destruction de certains AA, à l'isomérisation D - L d'autres, etc.

L'hydrolyse peut aussi être réalisée par voie enzymatique (protéases), mais on n'obtient généralement que des polypeptides, et non les AA eux-mêmes.

Nombre d'acides aminés - Titration au formol.

Une protéine ne contient théoriquement qu'une seule fonction acide libre et une seule fonction amine libre, les autres étant engagées dans les liaisons peptidiques. Cependant les acides dicarboxyliques ou diaminés éventuels présentent une fonction libre chacun.

On prend l'exemple d'une protéine n'ayant ni acide dicarboxylique, ni acide diaminé. On bloque la fonction amine terminale par réaction au formol. Il ne reste que la fonction acide libre. Un dosage acide - base donne un certain volume de base nécessaire à la neutralisation de la fonction acide. On refait la même expérience avec la protéine hydrolysée. Cette fois, toutes les fonctions acides sont disponibles, et il faut d'autant plus de base pour les neutraliser. Le rapport entre les deux volumes donne une approximation du nombre d'acides aminés composant la protéine.

Détermination de la séquence propre en AA.

Méthodes chimiques.

O_2N / F / NO_2 + $H_2N - CH(R) - COOH$ → O_2N / $HN - CH(R) - COOH$ / NO_2 + HF

Méthode de Sanger : Résidu N terminal.

Le dinitrofluorobenzène (NDFB) forme, avec la fonction N terminale, un dérivé avec libération d'acide fluorhydrique. L'hydrolyse de la protéine libère ensuite le composé dérivé, qui présente des caractéristiques propres de coloration et de migration en chromatographie ou en électrophorèse. En comparant le résultat de l'analyse aux standards connue et à l'hydrolyse "simple" pratiquée plus haut, on peut connaître l'acide aminé N terminal.

Dansylation : Résidu N terminal.

Le chlorure de 1-***d***inéthyl-***a***mino-***n***aphtalène-5-***s***ulfonyle (DANS) réagit avec le NH_2 terminal et donne un dérivé (dansyl-amino-acide) décelable par sa fluorescence jaune. La méthodologie est la même que dans le cas de la méthode de Sanger, mais la réaction est 100 fois plus sensible. La dansylation est utilisée pour doser les acides aminés par HPLC car elle permet une meilleure détection et une meilleure quantification.

Méthode d'Edman : Résidu N terminal.

Peptide 1

Phénylthioisocyanate

Phénylthiodantoine

Peptide 2 = peptide 1 (-) AA 1

Le phénylthioisocyanate donne une phénylthiodantoine avec l'acide N terminal. Il libère un nouveau polypeptide, ayant un AA de moins que le précédent, avec lequel il peut alors réagir. Cette détermination est donc dite récurrente. En l'arrêtant à temps, ou en utilisant diverses méthodes mathématiques, on peut ainsi connaître de proche en proche la composition complète de la molécule. Cette technique a été utilisée dans un appareil automatisé.

Réaction à l'hydrazine : Résidu C terminal.

$$(HN-CH(R)-CO)_n-NH-CH(R_1)-COOH + (H_2N-NH_2)_n \longrightarrow (H_2N-CH(R)-CO-NH-NH_2)_n + H_2N-CH(R_1)-COOH$$

Un traitement à l'hydrazine à 100°C hydrolyse toutes les liaisons peptidiques, et libère des hydrazides de tous les AA sauf le C terminal, qui se présente comme un AA libre normal. Il est alors facile à isoler et à identifier.

Méthodes enzymatiques.

Pour chacune des extrémités, il existe une enzyme particulière qui hydrolyse les acides terminaux. Il s'agit de la **carboxypeptidase** et de **l'aminopeptidase**, qui libèrent respectivement l'acide C-terminal et l'acide N-terminal. Il s'agit de méthodes récurrentes, qui dé-

gradent le polypeptide dans toute sa longueur. On parvient à connaître la séquence grâce à la vitesse de libération des acides aminés.

Structure secondaire.

L'encombrement stérique des acides aminés et les angles des liaisons font que l'enchaînement n'est pas linéaire, mais présente un certain nombre de replis. En outre, les différentes portions des replis peuvent établir entre elles des liaisons qui vont contribuer à consolider la structure.

Liaisons intervenant dans la structure spatiale.

Liaison disulfure.

C'est une liaison covalente forte établie entre deux résidus cystéine appartenant à une seule chaîne ou à deux chaînes différentes.

Liaison ionique (ou saline).

C'est une liaison électrovalente (plus faible) établie entre deux charges de signe opposé : NH_3^+ et COO^-. Ce type d'interaction permet la liaison de deux molécules de type différent dans les hétéroprotéines.

Liaison hydrogène.

Ce type de liaison non covalente se forme lorsque sont à proximité l'un de l'autre d'une part un atome d'hydrogène lié à un azote ou à un oxygène, et d'autre part un doublet électronique non partagé d'un autre azote ou d'un autre oxygène.

Ces liaisons peuvent s'établir entre :

⇒ les C=O et les N-H des liaisons peptidiques ;

⇒ les radicaux des résidus d'acides aminés, impliquant par exemple les noyaux phénoliques, le γ carboxyle du glutamate, etc.

Liaison hydrophobe.

Les chaînes latérales hydrophobes de certains acides aminés (Ala ; Val ; Leu ; Ile ; Phe) sont repoussées par l'eau et ont donc tendance à se rapprocher les unes des autres (interactions de type Van der Waals).

2. Propriétés spatiales de la liaison peptidique.

La liaison peptidique peut s'écrire sous deux formes : **elle possède donc un caractère de double liaison**, ce qui implique que les atomes soient tous dans le même plan. Il existe une possibilité d'isomérie cis - trans pour les résidus de part et d'autre de la liaison. Ces propriétés entraînent trois possibilités de conformation spatiale :

⇒ les plans successifs alternent de part et d'autre selon deux orientations privilégiées, et on parlera de structure en feuillet plissé ;

⇒ les plans successifs tournent régulièrement dans le même sens, et on parlera de structure hélicoïdale ;

⇒ il n'y a pas de direction privilégiée, et on parlera de pelote statistique.

Feuillets plissés.

Protéines fibreuses. Liaisons hydrogènes inter-chaînes

Hélices a.

Protéines globulaires. Liaisons hydrogène intra-chaîne.

Structure tertiaire.

Définition.

Une protéine peut en fait adopter les différents types de structure secondaire en différents endroits de sa structure primaire, ou selon les conditions extérieures. Il s'ensuit que la molécule acquiert un encombrement stérique particulier : la conformation de la protéine.

Notion de site actif.

Le volume est rempli par les acides aminés. Des acides éloignés dans la structure primaire peuvent se placer à proximité les uns des autres, voire établir de nouvelles liaisons. L'environnement électronique des acides est donc modifié. Des cryptes peuvent se former : en fonction de la nature des acides aminés et de l'espace vide qu'ils entourent, certaines molécules extérieures pourront venir s'y placer, mais pas d'autres. Parmi les molécules pouvant se fixer, certaines subiront des modifications : site de fixation et site actif des enzymes.

Structure quaternaire.

Il arrive qu'une protéine seule ne soit pas fonctionnelle. Il faut que plusieurs molécules de la même protéine s'associent pour que la fonction soit assurée. On parle alors de monomères s'associant en oligomères ou en polymères.

Dans certains cas, l'association concerne plusieurs oligomères d'une même protéine, mais parfois il s'agit de monomères de molécules différentes : cas des porines (8 fois la même protéine, formant canal) ou de la RubisCO (2 x 4 protéines)…

La dénaturation d'une protéine peut correspondre à la rupture des liaisons entre les chaînes. Sans atteinte aux liaisons peptidiques, la protéine perd alors ses propriétés fonctionnelles.

Principales propriétés des protéines.

Solubilité.

Elle est très variable, et dépend de plusieurs facteurs :

Electrolytes.

Les sels neutres à faible concentration ont un effet dissolvant, tandis qu'à forte concentration, ils provoquent la précipitation des protéines. On peut alors séparer les différentes classes de protéines en fonction de la concentration à laquelle elles précipitent. On ajoute progressivement du sel (ex. sulfate d'ammonium) dans le milieu. Entre chaque ajout, on centrifuge et on recueille la fraction ayant précipité.

pH.

La solubilité d'une protéine est minimale au voisinage de son pHi. Dans certains cas, on peut obtenir la cristallisation d'une protéine en augmentant progressivement sa concentration tout en la maintenant à son pHi.

Solvant organiques.

L'éthanol, le méthanol et l'acétone peuvent être utilisés pour faire précipiter les protéines.

Détermination de la masse moléculaire.

Les masses moléculaires peuvent varier de 10 000 à plus de 1 000 000.

Filtration sur gel de dextrane.

Les gels utilisés sont de type Sephadex. Ce sont des polymères glucidiques synthétiques ayant des liaisons croisées. Ces liaisons déterminent une certaine porosité. On parle de tamisage moléculaire : les plus grosses molécules, exclues du gel, passent rapidement, tandis que les plus petites sont retenues par le réseau. On commence par étalonner le gel en faisant passer des molécules de masse connues et en mesurant leur temps de rétention, puis on fait passer des échantillons de masse inconnue, et on compare leur temps de rétention à ceux mesurés.

Ultracentrifugation. Sédimentation.

La centrifugation à haute vitesse d'une solution de protéine provoque sa sédimentation en fonction de sa densité (qui est nécessairement supérieure à celle du solvant). Grâce à des systèmes optiques, on peut suivre cette sédimentation au cours du temps. On parvient à séparer les différentes protéines de la solution, et à les comparer à des témoins.

On peut aussi utiliser un solvant de densité variable, et les protéines vont alors se placer dans la zone correspondant à leur densité. Cette méthode est aussi appliquée à la séparation des organites cellulaires.

Electrophorèse.

L'électrophorèse, notamment sur gel de polyacrylamide (PAGE), utilise le caractère amphotère des protéines. Placées dans un champ électrique, elles se déplacent vers l'électrode qui les attire. Comme dans les autres cas, la comparaison à des protéines de référence permet de savoir leur masse moléculaire.

Classification des protéines.

Classification selon la forme des molécules.

Protéines fibreuses ou scléroprotéines.

Pratiquement insolubles. Fibroïnes de la soie ; collagènes (tissus conjonctifs… transformables par la chaleur en gélatines) ; kératines.

Protéines globulaires ou sphéroprotéines.

Forme générale sphérique ou ovoïde.

Classification selon la solubilité.

Albumines.

Solubles dans l'eau distillée. Précipitent par addition de sulfate d'ammonium entre 70 et 100% de la saturation. pHi < 7 (caractère acide).

Globulines.

insolubles dans l'eau pure, mais solubles dans les solutions salines diluées (NaCl 5%), précipitent par addition de sulfate d'ammonium à 50% de la saturation. Souvent des glycoprotéines ou lipoprotéines.

Protamines et histones.

Solubles, taille petite (plutôt polypeptides que protéines) ; très basiques (lysine et arginine) $\Rightarrow$ pHi élevé.

Globines.

solubles dans l'eau.

Prolamines et glutélines

Protéines végétales insolubles dans l'eau, mais solubles dans les acides et les bases dilués.

Classification selon la composition.

Holoprotéines.

Elles ne sont constituées que d'acides aminés.

Hétéroprotéines.

Elles comportent une ou plusieurs chaînes peptidiques associées (homoprotéine) liées par covalence à un groupement prosthétique de nature non glucidique. La nature de ce groupement est extrêmement variée :

- glucide glycoprotéines
- lipide lipoprotéines
- phosphate phosphoprotéines
- ion métallique chromoprotéines (hémoglobines, cytochromes)

Acides nucléiques

Introduction

Constituants universels de la matière vivante, représentant 10 à 20 % de la masse sèche.

Caractère acide

Regroupés en deux classes :

acides désoxyribonucléiques = ADN

acides ribonucléiques = ARN

Composition

ß D ribose

ß 2 désoxy D ribose

Oses

Deux pentoses peuvent entrer dans la composition des acides nucléiques : le ribose ou sa forme 2 désoxy.

Bases azotées

Les constituants de base des acides nucléiques sont des composés portant plusieurs fonctions amines, ce qui leur confère un caractère basique. On distingue deux groupes : les bases puriques et les bases pyrimidiques.

Bases puriques

Deux bases puriques principales sont trouvées dans les acides nucléiques : la guanine et l'adénine.

Purine	Adénine = 6 amino-purine	Guanine = 2-amino-6-oxy-purine

Il existe d'autres bases naturelles, que l'on trouve par exemple dans certains ARNt, ainsi que des dérivés ayant des fonctions particulières, notamment des hormones végétales (cytokinines, impliquées dans la division cellulaire).

Bases pyrimidiques

Elles dérivent de la pyrimidine.

Pyrimidine	Cytosine (2-oxy-4-amino-pyrimidine)	Uracile (2,4-dioxy-pyrimidine)	Thymine (2,4 dioxy-5-méthyl pyrimidine ou 5-méthyl-uracile)

Comme dans le cas des bases puriques, il en existe d'autres, par exemple dans l'ADN de certains bactériophages (virus infectant des bactéries).

La cytosine et l'uracile se trouvent dans les ARN, mais la thymine remplace l'uracile dans les ADN.

Adénosine dCytosine

Nucléosides

La liaison d'une base et d'un pentose forme un nucléoside. On numérote les atomes de la base de 1 à 9 (bases puriques) ou de 1 à 6 (bases pyrimidique). Pour ne pas les confondre, les atomes du pentose sont numérotés de 1' à 5'.

Nucléotides.

Nucléotides monophosphate.

La fonction alcool primaire du carbone 5' du pentose peut être estérifiée par un acide phosphorique. On obtient alors un nucléotide. Il peut être monophosphate s'il n'y a qu'un seul phosphore.

Base	**Ribonucléoside**	**Ribonucléotide**	
Adénine	Adénosine	Adénylate	Adénosine monophosphate (AMP)
Guanine	Guanosine	Guanylate	Guanosine monophosphate (GMP)
Uracile	Uridine	Uridylate	Uridine monophosphate (UMP)
Cyto-sine	Cytidine	Cytidylate	Cytosine monophosphate (CMP)

Base	**Désoxyribonucléoside**	**Désoxyribonucléotide**	
Adénine	Désoxyadénosine	Désoxyadénylate	Désoxyadénosine monophosphate (dAMP)
Guanine	Désoxyguanosine	Désoxyguanylate	Désoxyguanosine monophosphate (dGMP)
Uracile	Désoxyuridine	Désoxyuridylate	Désoxyuridine monophosphate (dUMP)
Thymine	Thymidine	Thymidylate	Thymidine monophosphate (TMP)

Nucléotides diphosphate et triphosphate.

Les molécules d'acide phosphorique portées par le pentose peuvent se lier à d'autres molécules du même acide par une liaison dite phosphodiester. Ces liaisons demandent une grande énergie pour leur formation, mais peuvent restituer cette énergie lors de leur hydrolyse.

ATP

Adénine

Ribose

UTP

Uracile

Ribose

Structure

Structure primaire

L'alternance pentose - phosphate crée le squelette de l'acide nucléique (ADN et ARN).

Structure secondaire de l'ADN

Watson et Crick, 1953.

⇒ $\frac{A}{T} = \frac{G}{C} = 1$ et $\frac{A + G}{T + C} = 1$ ou $A + G = T + C$, c'est à dire qu'il y a autant de bases puriques que de bases pyrimidiques.

⇒ En revanche, $\frac{A + T}{G + C}$ est très variable et spécifique.

⇒ Les études en Rx (après cristallisation) montrent qu'il s'agit d'une hélice.

⇒ Il existe des liaisons hydrogène.

⇒ La structure est celle d'une double hélice. ; il y a appariement des bases homologues.

La molécule hélicoïdale est dextrogyre. Le pas de l'hélice est de 30Å, le diamètre de 20Å.

Il y a toujours la même quantité d'ADN dans un noyau, et une composition fixe en bases azotées pour tous les types cellulaires d'un espèce donnée.

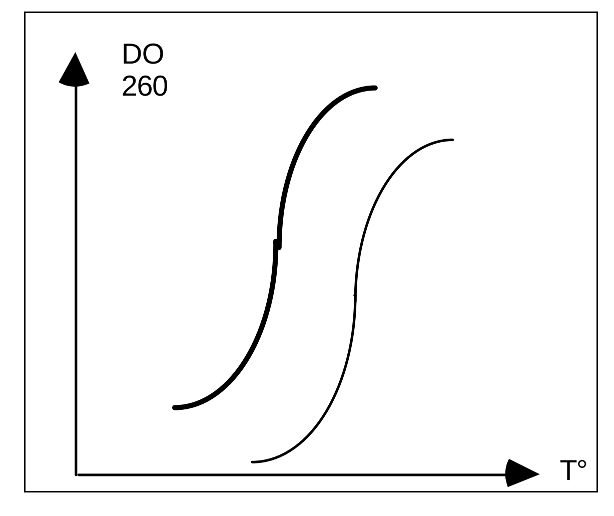
La complémentarité des bases st essentielle à la stabilité de la double hélice. Les deux chaînes sont opposées, ou anti-parallèles.

Propriétés de l'ADN

L'ADN est soluble dans l'eau sous forme de sels de sodium (en donnant une solution visqueuse). Il précipite dans l'éthanol (⇒ moyen efficace pour l'isoler puis l'étudier).

La présence des bases provoque une absorption caractéristique dans l'UV à 260 nm. Cette absorption est de 30% inférieure à celle d'un mélange comportant la même quantité de bases et les mêmes proportions que l'ADN étudié : c'est l'effet hypochrome, dû aux liaisons hydrogènes entre les bases des deux brins.

Dénaturation thermique. A partir d'une solution d'ADN natif, lorsqu'on augmente progressivement la température, on constate une élévation de la DO_{260} ⇒ courbe de fusion de l'ADN.



Cette augmentation brusque de la DO est appelée effet hyperchrome. En même temps, on note une diminution de la viscosité de la solution.

La courbe de fusion correspond à la séparation des deux brins qui forment l'hélice. La rupture des liaisons hydrogène provoque une déspiralisation de la molécule. L'ADN devient monocaténaire, il est dénaturé.

Les courbes de fusion de deux molécules d'ADN présentent des valeurs différentes de température de demi-dissociation à cause d'une composition différente en bases : lorsque la teneur en G+C augmente, la température augmente aussi.

Le phénomène est réversible par simple refroidissement progressif de la solution. L'ADN reforme la double hélice et redevient donc bicaténaire. Si le refroidissement est brusque, les chaînes restent monocaténaires.

La reformation de la double hélice est d'autant meilleure que la complémentarité entre les brins est plus grande. En conséquence, si on place dans la solution deux brins bicaténaires différents, et qu'on chauffe, les deux donnent chacun deux brins. Lors du refroidissement, les sections ayant des bases homologues pourront s'apparier, tandis que les sections non homologues ne le pourront pas. Il y a formation de portions bicaténaires, et de portions en boucles non appariées. C'est l'hybridation des acides nucléiques.

Structure secondaire des ARN

Structure et propriétés générales

Leur masse moléculaire est plus faible que celle des ADN : ils sont plus petits. Ce sont des chaînes monocaténaires de nucléotides : A, G, C, U. Il peut y avoir des portions complémentaires de parties différentes de la chaîne créant des replis : zones bicaténaires, stabilisées par des liaisons hydrogènes.

Leur solubilité et leur absorption dans l'UV sont proches de celles de l'ADN. On n'obtient pas dans leur cas de courbe de fusion directement comparable à celle de l'ADN, mais en revanche, on peut provoquer l'hybridation d'un ADN et d'un ARN. IL n'y a pas d'effet hyperchrome ni d'effet hypochrome.

Différents types d'ARN

A part dans le cas des Virus, le cellules présentent trois types différent d'ARN au moins.

ARN messagers = ARNm

Il s'agit de la séquence complémentaire d'une portion de l'ADN de la cellule. Il est obtenu par transcription à partir de l'ADN.

Transcription : on garde le même langage (c'est à dire le code génétique), mais on change d'alphabet (T -> U).

Traduction : on change de langage ⇒ du code génétique en codon, on passe aux protéines constituées d'acides aminés. Moyen mnémotechnique : les opérations se font dans l'ordre alphabétique inverse.

Les ARN messagers sont "linéaires". Leur masse moléculaire est très élevée, en liaison avec la taille de la protéine qu'ils codent. Elle évolue au cours de leur maturation (maturation post transcriptionnelle) : une partie de ce qui a été transcrit est éliminé. En particulier, ils sont souvent précédés, à leur extrémité 3' d'une chaîne de plusieurs adénosines (30 à 200) : ARNm poly A. Cette séquence à une rôle signal intervenant dans la reconnaissance avec les ribosomes.

Les ARNm ont une durée de vie courte (demi-vie de quelques heures pour la plupart), sauf dans des cas particuliers, par exemple dans les formes de vie ralentie comme les graines des végétaux.

ARN de transfert = ARNt

Les ARNt ont généralement une configuration en feuille de trèfle. Ils présentent des replis et des zones appariées. Une des boucle porte l'anti-codon, c'est à dire le triplet de bases

complémentaires du triplet codant de l'ARN messager. L'extrémité 3' porte l'acide aminé pour lequel code le codon.

ARN ribosomiaux = ARNr

Ils représentent 80% de l'ARN total de la cellule. Leur masse moléculaire est très importante. On les distingue sur la base de leur coefficient de sédimentation. Un ribosome est formé de plusieurs chaînes d'acide nucléique.

Les acides nucléiques particuliers

Les bactéries et les virus (procaryotes), d'une part, ainsi que les chloroplastes et les mitochondries ont des acides nucléiques comparables à ceux des autres cellules d'un point de vue général, mais présentant un certain nombre de particularités à connaître.

L'ADN n'est par organisé en chromatine ni en chromosome ; il n'est pas enfermé dans une enveloppe nucléaire.

Le code génétique est légèrement différent. C'est chez ces organismes qu'on rencontre le plus de bases rares.

Les ribosomes ont des coefficients de sédimentation différents.

Les rétrovirus présentent la particularité de posséder uniquement une molécule d'ARN, mais pas d'ADN. Cet ARN doit d'abord être transcrit en ADN par la cellule hôte. L'enzyme impliquée est la transcriptase reverse.

Méthodes d'étude

L'extraction se fait à partir d'un **matériel riche** en acide nucléique : de préférence des **cellules jeunes**, en division. Après **broyage** (fort, de façon à faire éclater les noyaux) et sou-

vent **délipidation**, l'extraction se fait dans une **solution saline**. L'extrait contient alors généralement un mélange de protéines et d'acides nucléiques.

Les protéines sont éliminées par centrifugation, puis les acides nucléiques sont précipités par l'éthanol.

On peut effectuer un dosage colorimétrique portant soit sur le phosphore, soit sur le pentose.

La séparation des différentes classes d'acides se fait généralement par électrophorèse sur gel, avec des techniques variée (biologie moléculaire). On parvient à caractériser des groupes d'ARN, par exemple, caractéristiques de telle ou telle phase du développement de l'organisme, c'est à dire que les protéines correspondantes ne sont synthétisées qu'à certaines périodes de la vie.

La localisation cellulaire peut être faite par diverses méthodes.

Une coloration de type Feulgen colore spécifiquement l'ADN en rose.

Après l'ajout d'une molécule marquée (par exemple thymine triciée), certaines molécules d'ADN seront marquées. La préparation cellulaire est fixée, puis on la place sous une plaque photographique. Les grains d'argent de l'émulsion photographique sont impressionnés par l'émission radioactive, ce qui permet de localiser les compartiments cellulaires dans lesquels s'est fait l'incorporation.

Méthodes d'étude

Préparation de l'échantillon :

Fractionnement cellulaire

Constitution générale des tissus et des cellules

De l'extérieur vers l'intérieur :

Tissu = $\sum$ de cellules, entre lesquelles il n'y a pas de vide, mais des parois végétales, des constituants interstitiels animaux, le tout baignant dans un liquide ± complexe ⇒ on peut avoir besoin d'analyser les constituants en question.

Cellule :

membrane plasmique : lipides, protéines

cytoplasme / cytosol : gel de protéines, de sels minéraux, de toutes sortes de molécules

organites : enveloppe de 2 membranes + matrice (stroma) propres.

Fractionnement

Lorsque le compartiment cellulaire n'est pas abordable directement, il faut commencer par le séparer des autres parties du tissu ou de la cellule (le sang est directement isolable, par exemple).

Broyage

fin, mais trop long = pertes / polytron, Moulinex, mortier - pilon, sable de Fontainebleau,…

⇒ poudre fine de préférence

- pH fixé / tampon
- anti-oxydant (pb phénols)
- à froid (enzymes en général)
- BSA : protéases
- osmoticum : organites
- qualitatif / quantitatif : les impératifs ne sont pas les mêmes

Séparation

Solubilisation

selon le composé à isoler :

- solvant organique ⇒ lipides et composés apolaires
- solvant aqueux ⇒ composés polaires : glucides, acides aminés, peptides, ARN de petite taille,…
- insolubles ⇒ nombreuses substances de composition particulière, ou encore de taille importante

Mélanges ou successions de solvants :

Un premier passage d'un solvant organique peut par exemple éliminer les lipides (délipidation), et laisser les autres composés. Une élimination spécifique d'un composé est parfois plus efficace qu'une tentative de purification directe du composé cherché.

Filtration

La méthode la plus simple de séparer un élément soluble des éléments insolubles (exemple type : la percolation du café!)

Après fractionnement, il reste : des débris cellulaires, des cellules, des organites de taille variable, qui resteront sur le papier filtre.

Centrifugation

L'application d'une force centrifuge à un échantillon (liquide ou pâteux) équivaut à l'application d'une force gravitationnelle contrôlée. On sépare donc les composés en fonction de leur masse et de leur densité.

Milieu de séparation : tous les composés de densité supérieure à celle du milieu surnageront, tandis que tous les composés de densité inférieure sédimenteront. Le résultat est le même que celui de la filtration.

Centrifugation sur gradient : il est possible de créer un gradient de densité le long du tube à centrifuger. Les composés / organites se placent dans la zone correspondant à leur densité.

Exemple : fractionnement du foie de Rat

Homogénat	
↓ 10 min. à 600 g →	culot
	↓ 10 min. à 600 g
surnageant	culot : noyaux et débris cellulaires
↓ 10 min. à 8 000 g →	culot : mitochondries

↓ 10 min. à 15 000 g → culot : lysosomes

↓ 60 min. à 100 000 g → culot : microsomes

surnageant : molécules

Purification

Solubilité différentielle

Exemple : purification des chlorophylles à partir de feuilles d'orties :

Broyage, extraction dans l'acétone à 85% : solubilisation de tous les composés apolaires, plus une partie des composés polaires.

Filtration sur papier

Chlorure d'ammonium 10% : précipitation des protéines

Ether : les chlorophylles passent préférentiellement dans l'éther, la phase acétone - eau devient limpide ⇒ élimination

Lavages à l'eau : certaines impuretés peuvent rester dans la phase éthérée, les lavages permettent de les reprendre et de les éliminer

Méthanol : la chlorophylle b est plus soluble dans l'éthanol que dans l'éther, inverse pour la chlorophylle a ⇒ les deux chlorophylles sont séparées et peuvent être (théoriquement) étudiées séparément.

Techniques chromatographiques

Lorsque plusieurs composés présentent les mêmes caractéristiques de solubilité, on peut les séparer par chromatographie : exemple de mélange de composés polaires :

broyage, extraction à l'eau, filtration : les lipides et les grosses protéines restent sur le filtre, les glucides et les acides aminés passent dans le filtrat.

Chromatographie d'exclusion : les plus grosses molécules (polypeptides, polyosides) passent rapidement et sont exclues, les petites (acides aminés et glucides simples) sont recueillies ensuite.

Chromatographie d'échange ionique :

- une colonne échangeuse d'anions retient tous les composés cationiques (chargés positivement) : acides aminés dibasiques notamment
- une colonne échangeuse de cations retient tous les composés chargés négativement : acides diacides notamment
- l'utilisation consécutive des deux colonnes permet de séparer le mélange en trois classes : acide, basique et neutre, la dernière correspondant aux glucides et aux acides aminés neutres.

Caractérisation

Techniques chromatographiques

Les chromatographies d'adsorption (sur papier, sur couche mince de cellulose ou d'aluminium), en phase gazeuse, d'échange d'ions ou d'exclusion permettent soit de faire une

séparation grossière, soit de faire une séparation fine, en fonction des conditions d'utilisation.

Exemple : chromatographie bidimensionnelle sur papier d'un mélange de composés polaires

- dépôt d'un échantillon dans un des coins de la feuille
- migration dans un premier solvant, volatil ; évaporation du solvant (une nuit à 40°C)
- migration dans un second solvant, après retournement de la feuille à 90°
- séchage, révélation

Electrophorèse

L'électrophorèse permet de séparer et de caractériser diverses classes de molécules : glucides simples ou composés, acides aminés, peptides et protéines. Elle convient un peu moins aux lipides.

Techniques colorimétriques

Révélation par coloration

Après une chromatographie ou une électrophorèse, les composés n'étant généralement pas colorés, on cherche leur emplacement sur la feuille grâce à une coloration : révélation à la ninhydrine pour les acides aminés, au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent pour les protéines, à l'anthrone pour les glucides, etc.

Dosages par colorimétrie

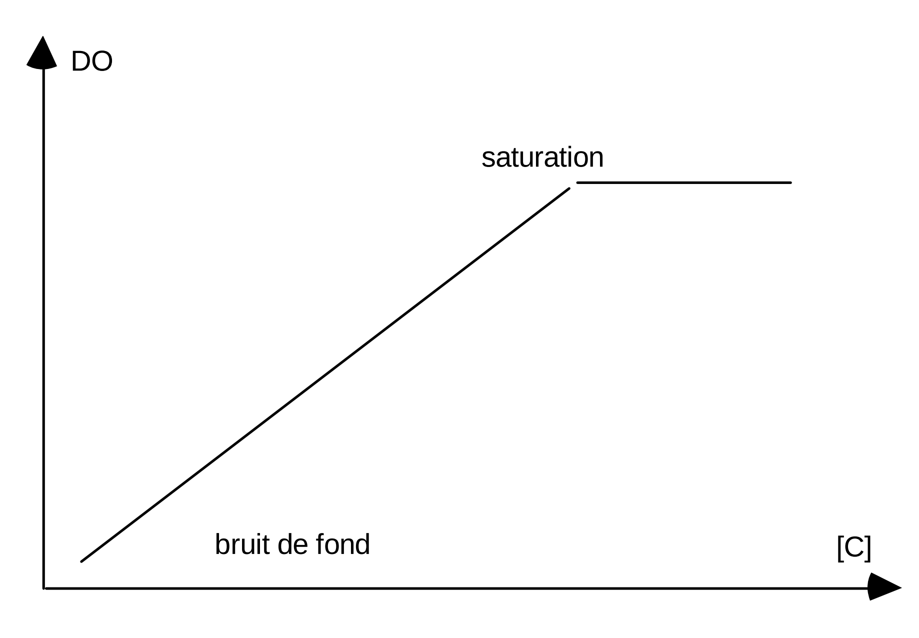
Lorsque la réaction est quantitative, on peut appliquer la loi de Beer-Lambert :

$$I = I_0 e^{-\varepsilon\, c\, l} \Leftrightarrow \log(I/I_0) = D.\ O. = \varepsilon\, c\, l$$

- avec ε = coefficient d'extinction molaire, dépendant - de la longueur d'onde ; - de la nature des liaisons du composé étudié
- c = concentration de la solution
- l = longueur du trajet optique, fixée à 1 cm

Puisque l, ε et λ sont fixés, on a la relation simple : D. O. = f([c]).

On choisit une gamme de concentrations, à laquelle on fait subir la réaction, et on trace la courbe obtenue :



Il ne faut pas oublier de faire un à blanc : il correspond à la valeur zéro de la concentration, et il permet de savoir quelle est l'absorption due spécifiquement au réactif, et non au produit à doser. L'à blanc doit accompagner toute série de déterminations, car les conditions peuvent varier (par exemple durée de passage et température du bain-marie).

Spectrométrie

Une autre application de la loi de Beer-Lambert est l'obtention de spectres. Dans ce cas, la concentration est fixée, mais on fait varier la longueur d'onde. La disparition des rayon-

nements d'une longueur d'onde correspond à l'absorption de l'énergie des photons concernés par une liaison particulière. Un pic d'absorption caractérise donc la présence d'une liaison dans la solution étudiée. Si la préparation est pure, on est donc à même de caractériser parfaitement le composé, en fonction des pics obtenus.

Techniques immunologiques

La faculté de reconnaissance antigène - anticorps est de plus en plus utilisée. La spécificité de la réaction est généralement totale, mais dans le même temps, elle ne donne pas de réponse d'une grande ampleur. A la détection est alors associée une amplification, sous forme d'une réaction enzymatique dont le produit est coloré.

Index

Table des matières